

梨黑星病菌的分离培养和基质研究^{*}

钮绪燕, 李丽青, 赵 华, 顾 彪, 艾海江

(西北农林科技大学 植保学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 用18种培养基对梨黑星病菌进行分离培养结果表明, 用PDA、改进PDA及PSA培养较易分离成功, 在改进PDA+L中营养生长速率最大, 20℃下培养20d菌落直径可达12mm, 并产生分生孢子。药效测定试验表明, 10.0 μg/mL的70%代森锰锌或5%杀菌清水剂及5.0 μg/mL的植物制剂20%苦皮藤水浸液, 对梨黑星病菌分生孢子萌发有很高的抑制作用, 抑制率分别达100%, 100%和78.71%。

[关键词] 梨黑星病菌; 培养基; 苦皮藤

[中图分类号] S436.612.1⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0080-03

梨黑星病(*Venturia prina* Aderh)是我国南北梨产区普遍发生的重要病害之一。近年来, 由于种植结构和品种布局的变化, 常导致梨黑星病大流行。梨黑星病不仅危害叶片、叶柄、嫩枝和果实, 而且常引起叶片早期脱落、果实畸形, 造成品质和产量下降, 严重影响树势和梨业生产。而该菌目前分离培养较困难, 人工培养下生长缓慢, 对研究该菌的生理生化特点、侵染发病规律、室内外药效试验等带来不便。为此, 作者等尝试筛选适宜于该菌分离和生长的培养基及有效的杀菌剂。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试病原菌 分别采自陕西杨陵、彬县、乾县果园。

1.1.2 供试培养基 先后共试用了18种固定配方与改良配方培养基, 其配方如下: (1)马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA); (2)马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA); (3)梨叶浸汁麦芽浸膏培养基(LY); (4)梨果浸汁麦芽浸膏培养基(LG); (5)PDA+梨果汁培养基(PDA+G); (6)甘氨酸等微量元素琼脂培养基(A); (7)PSA+梨果汁培养基(PSA+G); (8)PSA+梨块培养基(PSA+L); (9)PDA+熟梨块培养基(PDA+L); (10)PSA+胡萝卜块培养基(PSA+H); (11)PDA+熟胡萝卜块培养基(PDA+H); (12)木糖培养基(MD); (13)多种培养液(PB、

PDB); (14)燕麦片琼脂培养基(Y); (15)V8琼脂培养基(V8); (16)麦芽膏琼脂培养基(M); (17)牛肉浸膏琼脂培养基(N); (18)琼脂培养基(Q)。其中, PB、PDB为液体培养基, 其余均为固体培养基。

1.1.3 供试药剂 70%代森锰锌、5%杀菌清水剂和12.5%烯唑醇均为市售, 植物制剂20%苦皮藤水浸液由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 病菌分离 在上述17种固体培养基上, 分别用常规组织分离法和单孢分离法^[1,2]对所采病叶进行分离, 每种培养基分3皿, 每皿内放材料9块(单孢挑9个), 于10, 15, 20, 25, 30℃5种温度下培养, 选择最适温度, 并将分离物进行活体定点接种。

1.2.2 病菌在不同基质上生长速率测定 将分离物制成Φ4mm的菌饼, 接入上述18种培养基, 每处理重复3次, 20℃下黑暗培养, 观察菌丝生长情况。

1.2.3 药效测定 用孢子萌发法^[1,2]测定70%代森锰锌、5%杀菌清水剂、12.5%烯唑醇、植物制剂20%苦皮藤水浸液对梨黑星病菌的抑制作用。4种药剂均设置0.625, 1.25, 2.5, 5.0和10.0 μg/mL 5个浓度, 以清水为对照, 置20~23℃下培养12h。萌发百分率及抑制率计算公式如下:

$$\text{萌发率}/\% = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{总孢子数}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100\%$$

* [收稿日期] 2003-04-29

[基金项目] 西北农林科技大学重点科研项目; 西北农林科技大学推广项目

[作者简介] 钮绪燕(1958-), 女, 陕西白河人, 实验师, 主要从事植物病理学研究。

2 结果与分析

2.1 分离基质筛选

各种培养基上的分离结果表明, 在 PDA + G、PSA、PDA、PSA + G、PSA + L、PSA + H、PDA + L' 培养基上, 以组织分离法可获得梨黑星病菌。单孢分离仅在 PDA + G、PSA、PDA 培养基上见到极少菌落, 在 LY、LG 培养基上采用组织分离法所获病菌生长极弱, 在 V8、Y、M、A、LG、LY、N 等其余供试培养基上病菌生长缓慢, 且易被杂菌污染。将所得分离物接种于杨陵果园的梨树叶片上, 15 d 观察到产生的分生孢子, 证明分离成功。比较 5 种不同的温度处理在 PDA 培养基上对梨黑星病菌生长的影响 (表 1), 结果表明, 梨黑星病菌分离培养的最适温度为 20~25 °C, 15 °C 以下及超过 25 °C 时, 生长缓慢。

表 1 不同培养温度对梨黑星病菌生长的影响(PDA)

Table 1 Effect of cultural temperature on growth rate of <i>Venturia prina</i>					
培养时间/d Culture date	菌落直径/mm Colony diameter				
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
7	1.0	1.0	2.5	2.0	1.0
14	1.0	1.8	5.5	5.0	1.5
21	3.0	6.5	8.7	8.7	2.0
28	5.1	8.5	19.5	18.8	2.6

表 3 不同药剂对梨黑星菌孢子萌发的药效试验结果

Table 3 Effect of fungicides on conidia gemination of <i>Venturia prina</i>								
药剂浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration of fungicide	70% 代森锰锌 70% mancozeb		5% 杀菌清水剂 5% chlorothalonil		12.5% 烯唑醇 12.5% diniconazole		20% 苦皮藤水浸液 20% chineses bittersweet	
	萌发率/% Gemination rate	抑制率/% Suppression rate	萌发率/% Gemination rate	抑制率/% Suppression rate	萌发率/% Gemination rate	抑制率/% Suppression rate	萌发率/% Gemination rate	抑制率/% Suppression rate
CK	66.54	-	66.54	-	66.64	-	66.64	-
0.625	45.08	32.25	42.38	36.31	50.08	24.85	48.36	27.03
1.25	38.98	41.42	41.42	42.44	37.27	44.77	35.56	46.64
2.5	33.28	50.00	26.67	59.78	27.00	59.48	32.74	50.87
5.0	7.60	88.38	3.02	95.46	-	-	14.19	78.71
10.0	0	100.00	0	100.00	-	-	-	-

3 讨论

用 17 种培养基对梨黑星病菌进行分离的结果表明, PDA、改进 PDA 及 PSA 较易分离成功, 组织分离法的成功率高于单孢分离法。其成功率的高低还与所采材料的新鲜程度关系密切, 试验表明, 如果在发病初期采褪绿斑或是刚产生微薄霉层的标本, 随采随分成功率可达 90% 以上, 反之, 成功率很低。据有关资料报道, 分离时采用麦芽琼脂培养基成功率最高^[3], 进入夏季不宜用单孢分离法。本研究结果表明, 只要分离过程中消毒时间掌握好, 将 pH 值调

2.2 病菌在不同培养基上的生长情况比较
培养基比较试验结果 (表 2) 表明, 梨黑星病菌在 PDA + L' 上生长最快, 一般 20 d 菌落直径可达 12 mm, 在 PDA + H'、PSA 及 A 上次之, G 上生长最慢。由于在其余培养基上生长极为缓慢, 故未再列表赘述。

表 2 不同基质上梨黑星病菌的生长速率(20 °C)

Table 2 Effect of medium on growth rate of <i>Venturia prina</i>			
培养时间/d Cultural date	菌落直径/mm Colony diameter		
	5 d	13 d	20 d
A	0.68	3.37	5.49
G	0.58	2.31	2.90
PSA	1.42	3.76	6.15
PDA + L'	1.45	5.07	12.00
PDA + H'	1.79	3.80	6.51

2.3 药效测定

表 3 表明, 70% 代森锰锌 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5% 杀菌清水剂 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对梨黑星菌孢子萌发的抑制率均高达 100%, 效果明显优于其他农药。植物制剂 20% 苦皮藤水浸液 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率也可达 78.71%, 这说明该植物制剂在防治梨黑星病中有很大潜力。

节到适宜于该菌生长的偏酸环境中, 一般在该菌发生时间 (4~10 月)^[4] 采集的标本用上述 PDA + G、PSA、PDA、PSA + G、PSA + L、PSA + H、PHA + L' 等培养基进行组织分离均可获得成功, 而且很少有污染, 20 °C 下 7~10 d 菌落直径可达 3~4 mm, 并产生少量分生孢子。本试验中也采用黑光灯照射, 意在诱导产孢^[5], 但发现其对该菌的生长有促进作用, 对产孢效果却不理想。另外, 利用无糖 PB 或降低糖含量的 PDB 进行培养, 菌丝生长也较快, 10 d 菌落直径可达 9~10 mm (用十字交叉法, 从瓶底测量其菌落直径^[1,2])。说明该菌在无糖或少糖条件下, 有利

于营养生长。虽然已有资料研究出了产孢方法^[6],但产孢量仍很少,室内药效试验还有赖于田间发病后采集的标本。其分离物的产孢机理、培养时需黑光还是黑暗、或是散光,以及基质营养等条件,均有待于进一步研究。

在药效测定试验中,10 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 70% 代森锰锌和 10 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5% 杀菌清水剂对梨黑星孢子的

萌发抑制率均高达 100%。植物制剂 20% 苦皮藤水浸液 5 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率也达 78.71%,虽低于试验中的化学农药,但其低毒、低残留、对环境无污染,且成本低,在杀菌剂领域具有很大的发展潜力。如果将该试剂的浓度加大是否也能达到与化学制剂相同或近似的效果,有待于进一步试验证实。

[参考文献]

- [1] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [2] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [3] 曲俭绪. 梨黑星病菌培养基的比较研究[J]. 北京林业大学学报, 1987, 9(2): 179- 180
- [4] 李建荣, 石万成, 文纯友, 等. 梨黑星病发生规律初步研究[J]. 西南农业大学学报, 1996, 18(6): 511- 514
- [5] 范燕萍, 冷怀琼. 梨黑星病菌的产孢研究[J]. 四川农业大学学报, 1991, 9(2): 291- 296
- [6] 李保华, 赵美琦, 张美蓉, 等. 梨黑星病菌分生孢子侵染及产孢研究[J]. 植物病理学报, 1998, 28(4): 297- 298

Isolation and medium selection of *Venturia prina*

NIU Xu-yan, LI Li-qing, ZHAO Hua, GU Bao, AI Hai-jiang

(Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, College of Plant Protection, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Modified PDA, PDA and PSA were three effective media used for isolation of *Venturia prina* among eighteen selected media. The great growth rate of mycelium has been obtained at 20 °C on the PDA + L. 10 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 70% mancozeb or 5% chlorothalonil and 5 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 20% Chinese bittersweet were effective for suppressing conidia germination of *Venturia prina*. The suppressive rate were 100%, 100% or 78.71% respectively.

Key words: *Venturia prina*; medium; Chinese bittersweet